

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-208599

(43)Date of publication of application : 12.08.1997

(51)Int.Cl.

C07K 14/745
A61K 9/127
A61K 9/127
A61K 38/00
A61K 49/00

(21)Application number : 08-021482

(71)Applicant : GREEN CROSS CORP:THE

(22)Date of filing : 07.02.1996

(72)Inventor : MATSUDA HIROSHI
KAMIIDE KAEKO
AMATSUJI YASUO
IMAGAWA TAKASHI
IKEDA YASUO
MURATA MITSURU

(54) GPIB-LIPID COMPOSITE MATERIAL AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject composite material containing a specific binding compound of a glucoprotein to a lipid and a lipid, and useful as a platelet substitute, a diagnostic medicine for von Willebrand's factor(vWF)-deficiencies, etc., because the composite material can be combined with the vWF and form aggregates.

SOLUTION: This GPIb-lipid composite material comprises (A) a binding compound of (A1) a glucoprotein GPIb [e.g. GPIb, its α -chain (fragment)] to (A2) a lipid having functional groups such as NH₂, COOH, SH or CHO [e.g. a glucoprotein bound with a crosslinking agent, PE-N-carbonyl (amine), PE- N-(dithio)acrylate, PE-N-maleimide acrylate], and (B) a lipid such as a phospholipid, a glucolipid, cholesterol, a fatty acid or their derivatives. The composite material is preferably prepared in the form of liposome.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.11.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3735921

[Date of registration] 04.11.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-208599

(43)公開日 平成9年(1997)8月12日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/745			C 07 K 14/745	
A 61 K 9/127			A 61 K 9/127	T
	ABZ			ABZM
38/00	ACB		49/00	A
49/00			37/02	ACB

審査請求 未請求 請求項の数 6 OL (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平8-21482

(22)出願日 平成8年(1996)2月7日

(71)出願人 000137764

株式会社ミドリ十字

大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

(72)発明者 松田 寛

大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株式会社ミドリ十字都島工場内

(72)発明者 上出 佳永子

大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株式会社ミドリ十字都島工場内

(72)発明者 天辻 康夫

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内

(74)代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G P I b・脂質複合体およびその用途

(57)【要約】

【解決手段】 G P I bと官能基を有する脂質との結合体および脂質とを含有する複合体。

【効果】 本発明のG P I b・脂質複合体はvWFと結合することができ、また、凝集を形成することができるので、血小板代用剤、血管障害、血管損傷および血栓症等の予防・治療等の医薬品として、あるいはvWF欠損症等を診断するための診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等として、また、血管損傷部位に特異的に蓄積する性質を有することから、血管障害および損傷部位および血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 G P I b と官能基を有する脂質との結合体および脂質とを含有する複合体。

【請求項2】 複合体がリポソームの形態である請求項1記載の複合体。

【請求項3】 請求項1記載の複合体を含有する血小板代用剤。

【請求項4】 標識物質および請求項1記載の複合体を含有する診断薬。

【請求項5】 薬物および請求項1記載の複合体を含有する薬物含有組成物。

【請求項6】 G P I b および官能基を有する脂質との結合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はG P I b・脂質複合体およびその用途に関する。さらに詳しくは、血管損傷部位の検査、診断および治療に有効に利用されうるG P I b・脂質複合体およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 血小板膜表面には各種糖蛋白(G P)が存在しており、血小板機能の発現に関与している。G P I bもこの血小板膜糖蛋白の一種であり、フォンヴィルブランド因子(v W F)の受容体として機能している。G P I bは α 鎖および β 鎖がジスルフィド結合した、分子量160,000のヘテロ二量体である。

【0003】 血管損傷が起きると、速やかに血小板が当該部位に粘着し、凝集などの反応を通じて血小板血栓を形成する。血小板血栓の形成にはv W Fが粘着性蛋白として重要な役割を果たすが、この時G P I bは受容体としてv W Fと結合し、当該血管損傷部位における、その後のv W Fを介した血小板の粘着・凝集反応を活性化あるいは促進する機能を有すると考えられている。また、v W FとG P I bの結合は、損傷血管における止血の機能の他に、病的血栓の形成にも関与している。従って、G P I bは血管損傷部位の検査や診断ならびに病的血栓の検出、さらには治療において有効に利用されることが期待される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、単離したG P I bを用いても、上述したような生理活性を人為的に発現させることはできなかった。すなわち、G P I bを医薬あるいは試薬として実用化するためには何らかの製剤的工夫が必要であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはこのような状況下、銳意研究を行った結果、G P I bと特定の脂質との結合体および通常の脂質とを含有する脂質複合体を調製することによって、はじめてその生理活性を発現できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち本発明は、(1) G P I bと官能基を有する脂質との結合体および脂質とを含有する複合体、(2) 複合体がリポソームの形態である上記(1)記載の複合体、(3) 上記(1)記載の複合体を含有する血小板代用剤、(4) 標識物質および上記(1)記載の複合体を含有する診断薬、(5) 薬物および上記(1)記載の複合体を含有する薬物含有組成物、および(6) G P I bおよび官能基を有する脂質との結合体に関する。

【0007】 (1) G P I bと官能基を有する脂質との結合体(G P I b結合体)

① G P I b

本発明で使用するG P I bとしては、G P I bそのもののほか、その α 鎖、v W F結合領域、すなわちG P I b α 鎖(His(1)-Thr(302))断片等のG P I b断片であってもよい。また、G P I bと同程度のv W F結合能を有していれば、その類似体、変異体、修飾体、誘導体、糖鎖付加物であっても本発明の範疇に含まれる。さらにこれらは膜貫通部位を欠失していてもよい。本発明において、より好ましいのはこの膜貫通部位を欠失したものである。

【0008】 具体的には、WO 92/16225、WO 93/13784、WO 93/16712、特開平1-100196、特開平1-221394および特表平5-503708等で開示されたG P I b関連物質が例示される。例えば、G P I b、G P I b α 鎖およびG P I b α 鎖断片として、His(1)-Ala(302)、His(1)-Arg(293)、Ala(165)-Leu(184)、Gln(180)-Phe(199)、His(195)-Leu(214)、Asn(210)-Val(229)、Glu(225)-Ala(244)、Thr(240)-Tyr(259)、Asn(61)-Thr(75)、Gln(71)-Ser(85)、Thr(81)-Leu(95)、Gln(97)-Arg(111)、Leu(136)-Leu(150)、Asn(210)-Ala(224)、Gln(221)-Asp(235)およびSer(241)-Asp(255)等が例示される。置換体として、His(1)-Ala(302)からなるG P I b α 鎖断片において、Gly(233)またはMet(239)を各々Valに置換したもの等が例示される。

【0009】 G P I bの調製方法に特別の制限はなく、血小板膜から抽出・単離する方法、細胞培養による方法、遺伝子工学的に产生する方法等が挙げられる。

【0010】 ②官能基を有する脂質
官能基を有する脂質中、G P I bと直接または間接的に結合可能な官能基としては、アミノ基(NH₂基)、カルボキシル基(COOH基)、チオール基(SH基)およびアルデヒド基(CHO基)等が挙げられるが、特に

これらに限定されるものではなく、GPIb分子と直接または間接的に結合反応を生じうるものであればどのようなものでもよい。

【0011】脂質の種類としては、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、グリセライトおよびコレステロール等、両親媒性のものであれば特に限定されない。

【0012】官能基を有する脂質の具体例として、リン脂質ではホスファチジルエタノールアミン（以下、PEとする）、ホスファチジルチオエタノール（例えば、1,2-ジオレオイル-s n-グリセロー-3-ホスファチジルチオエタノール等）が例示される。また間接的にGPIbと結合させる場合には、架橋剤（いわゆるスペーサー、リンカー）を予め結合したものも利用できる。このような架橋剤としては、例えば、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、ジチオカルボン酸およびマレイミドカルボン酸等が例示される。これらは炭素鎖がC₂₋₁₀であることが好ましい。当該架橋剤を結合したリン脂質として、PE-N-カルボニルアミン、例えば、PE-N-カブロイルアミン、PE-N-ドデカニルアミン、PE-N-グルタルリルアミン等；PE-N-カルボニル、例えば、PE-N-サクシニル、PE-N-グルタルリル（NGPE）、PE-N-ドデカニル（NDPE）等；PE-N-ジチオアシレート、例えば、PE-N-3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート等；PE-N-マレイミドアシレート、例えば、PE-N-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート；PE-N-ビオチニル等が例示される。脂肪酸としては、炭素数12～18のものが挙げられ、飽和脂肪酸でも、不飽和脂肪酸でもよい。例えば、バルミチン酸、オレイン酸およびラウリノ酸等が例示される。これらの脂質は反応性を高めるために、酸ハライド、酸無水物および活性エステル体の形態でもよい。

【0013】③GPIb結合体の調製

GPIbと官能基を有する脂質とは、直接的にまたは間接的、すなわち架橋剤を介して化学的に結合させることができる。本発明においてより好ましいのは間接的に結合させる態様である。GPIbと官能基を有する脂質との混合比は、モル比で1:1～1:20程度、好ましくは1:1～1:10程度である。

【0014】化学的結合においては、場合に応じて公知の縮合剤あるいは官能基の活性化剤を用いることができる。縮合剤および活性化剤として、カルボジイミド類、例えば、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロビル)カルボジイミド(EDCI)等、サクシンイミド類として、例えば、N-ヒドロキシサクシンイミド、N-ヒドロキシカルボニルホサクシンイミド(NHSS)等、チオール基の交換反応に用いるものとして、例えば、5,5'-ジチ

オビス(2-ニトロ安息香酸)、2,2'-ジチオビスビリジン等が例示される。二価性架橋剤としては、同反応性のものとして、例えば、ジメチルアジビンイミデーター、ジスクシンイミジルスペレート等、異反応性のものとして、例えば、スクシンイミジル-3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート、N-(6-マレイミドカブロイルオキシ)サクシンイミド、N-サクシンイミジル-6-マレイミドヘキサノエート等が例示される。

【0015】直接的に結合する具体的方法には、PEのアミノ基とGPIbのカルボキシル基をカルボジイミドで結合させる方法、GPIbの糖鎖を酸化してアルデヒド基とし、これとPEのアミンでシップベース結合する方法、GPIbのSH基と末端にSH基を有するリン脂質（例えば、1,2-ジオレオイル-s n-グリセロー-3-ホスファチジルチオエタノール等）を酸化状態でジスルフィド結合させる方法、糖脂質を酸化してアルデヒド基を得て、GPIbのアミノ基を結合する方法および脂肪酸をGPIbのアミノ基と結合する方法等が挙げられる。間接的に結合する具体的方法には、PEのアミノ基と架橋剤（ジカルボン酸）の一方のカルボキシル基をアミド結合し、もう一方のカルボキシル基とGPIbのアミノ基をアミノ結合する方法、PEのアミノ基と架橋剤（アミノカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、同架橋剤のアミノ基とGPIbのカルボキシル基をアミド結合する方法、PEのアミノ基と架橋剤（アミノカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、同架橋剤のアミノ基とGPIbの糖鎖を酸化して生成したアルデヒド基をシップベース結合する方法、PEのアミノ基と架橋剤（ジチオカルボニル化合物）のカルボキシル基をアミド結合し、架橋剤のジチオ部分とGPIbのチオール基を反応させてジスルフィド結合する方法、PEのアミノ基と架橋剤（ジチオマレイミド化合物）を結合させた後に、GPIbのチオール基を反応させることによりジスルフィド結合する方法、ホスファチジルチオエタノールのチオール基とGPIbのチオール基とを架橋剤（ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物およびハロカルボニルマレイミド化合物等）を用いて還元アルキル化により結合する方法およびPEのアミノ基と架橋剤（マレイミドカルボン酸）のカルボキシル基をアミド結合し、架橋剤のマレイミド部分とGPIbのアミノ基を反応させる方法等の公知の手法が例示される。

【0016】GPIb結合体の調製は界面活性剤の存在下で行ってもよい。界面活性剤は官能基を有する脂質を可溶化するものであれば特に制限はないが、GPIbの構造に影響を及ぼさないために非イオン性界面活性剤を用いる。特に臨界ミセル濃度(CMC)が高い方、例えば1mM以上のCMCを有するものが好ましい。具体的には、オクチルグルコシド(n-オクチル-β-D-グルコシド)、オクチルチオグルコシド、(n-オクチル-β-D-チオグルコシド)-3-(3-コラミドブ

ロビル)ジメチルアンモニオ]プロパン硫酸(CHAPS)およびN,N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)デオキシコラミド(deoxy-BIGCHA-P)等が例示される。その混合比は脂質:界面活性剤として、0.01:1~0.1:1程度(モル比)が好ましい。

[0017] (II) GPIb結合体と脂質との複合体(GPIb脂質複合体)

上記結合体と脂質との複合体は、脂質複合体として公知の形態をとることができる。例えば、リポソーム、ミセル、脂肪乳剤等が挙げられるが、特にリポソームの形態をとることが好ましい。

①脂質

ここで使用される脂質は単独で、または他の脂質と混合して脂質複合体(例えば、リポソーム)の形態をとりうるものであれば特に限定されない。そのような脂質としては、リン脂質、糖脂質、コレステロール、脂肪酸およびこれらの誘導体等が挙げられる。当該複合体を形成するための脂質は、生理的に許容され、そして代謝されうる無毒の脂質であればいずれも本発明に用いることができる。

[0018] リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ジセチルホスフェート、カルジオリビンおよびリゾホスファチジルコリン等が挙げられる。また、これらの脂質は大豆油または卵黄など天然の材料から抽出・精製したものでも、それらを水素添加して構成脂肪酸を飽和化したもの(水素添加リン脂質)でも、また更に構成脂肪酸を特定の脂肪酸、例えば、パルミチン酸またはミリスチン酸に置き換えたもの(ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルグリセロール等)であってもよい。具体的には、精製卵黄レシチン、水素添加精製大豆レシチン、卵黄由来ホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルグリセロール、ジステアリルホスファチジルコリンおよびジミリスチルホスファチジルコリン等が例示される。

[0019] 糖脂質としては、例えば、セラミド、セレブロシド、スフィンゴシン、サルファチド、ガングリオシド類およびグリセロ糖脂質類等が挙げられる。

[0020] 脂肪酸としては、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、ミスチリン酸、パルミチン酸およびステアリン酸等が挙げられる。脂質誘導体としては、ホスファチジルエタノールアミンおよび脂肪酸のポリオキシエチレン誘導体、脂肪酸およびコレステロールの多糖誘導体等が挙げられる。具体的には、ジステアリル-N-(モノメトキシポリエチレングリコールサクシニル)ホスファチジルエタノールアミン、ポリオキシエチレンパルミチン酸エステル、N-[2-(ステアロイルカルボキシア

ミノ)エチル]カルバモイルメチルマンナンおよびN-[2-(コレステリルカルボキシアミノ)エチル]カルバモイルメチルブルラン等が例示される。

[0021] ②複合体化

GPIb:脂質の混合比としては、モル比で1:10~1:1000程度、好ましくは1:50~1:200程度である。

[0022] 脂質複合体(例えば、リポソーム)の調製は、例えば、界面活性剤除去法、水和法、超音波法、逆相蒸留法、凍結融解法、エタノール注入法、押出し法(extrusion法)および高圧乳化法等で行うことができる。界面活性剤除去法としては、ゲル濾過、透析および限外濾過等が一般的に用いられる。なお、GPIbと脂質との複合体化は、GPIbと官能基を有する脂質との結合後に行う方法、すなわちGPIb結合体を調製後に、脂質複合体にする方法がより好ましい。ただし、(I)②の官能基を有する脂質と(II)①の脂質からなる脂質複合体(リポソーム)を調製後に、GPIbを添加して、官能基を有する脂質とGPIbを結合させることにより、GPIb・脂質複合体を調製すること也可能である。GPIb・脂質複合体の単離・精製は遠心分離およびゲル濾過等の自体公知の手段にて行うことができる。

[0023] 以下に、具体例として、GPIb・脂質複合体の製法を説明する。

(i) GPIb結合体を調製後に、脂質複合体とする方法

GPIb、脂質[(II)①]および界面活性剤で可溶化した官能基を有する脂質[(II)②]を適当な水性溶媒中で混合し、まず、GPIbと官能基を有する脂質とを結合させた後に、界面活性剤を除去することによりGPIb・脂質複合体を形成させる。なお、GPIbと官能基を有する脂質を界面活性剤の存在下に混合して、GPIb結合体を調製した後に、更に脂質を混合し、界面活性剤を除去する手法によってもよい。未反応のGPIb、脂質等を分離除去して精製品を得る。界面活性剤の定義は、前記と同義である。また、その混合比は、脂質:界面活性剤として0.001:1~0.1:1(モル比)程度である。

(ii) 脂質複合体(リポソーム)を調製後にGPIbを結合させる方法

官能基を有する脂質[(I)②]および脂質[(II)①]を有機溶媒、例えば、クロロホルム、エタノール等に溶解・混合した後に、有機溶媒を除去して、脂質薄膜を調製する。適当な水性溶媒を加えて、振盪あるいは攪拌等の公知の手法により、脂質複合体を形成する。さらに、GPIbを添加して、GPIbと官能基を有する脂質とを結合させる。未反応のGPIb、脂質等を分離除去して精製品を得る。

[0024] 得られたGPIb・脂質複合体における脂

質に対するGPIbの割合は、脂質1重量部に対して、0.01～1.0重量部、好ましくは0.1～5重量部である。

【0025】得られたGPIb・脂質複合体の粒子径は約500～500nm、好ましくは約100～400nmである。

【0026】GPIb・脂質複合体（例えば、リボソーム）の構造としては、マルチラメラベシクル（MLV）、スマールユニラメラベシクルおよびラージユニラメラベシクル等が挙げられる。さらに、PEG、ブルロニック等親水性ポリマー（誘導体）で被覆したものも挙げられる。

【0027】得られたGPIb・脂質複合体は、次いで要すれば、生理的に許容される水溶液で洗浄し、除菌濾過、分注を行い、液状製剤、ペレット状および懸濁状製剤として調製する。

【0028】製剤化は医薬品の製法において広く公知の方法に準ずる。また、本製剤は液状製剤を凍結させた後、減圧下で乾燥させ、凍結乾燥製剤としても提供される。なお、凍結乾燥する場合は保護剤として、単糖類（例えば、ブドウ糖等）、二糖類（例えば、蔗糖等）等を配合してもよい。

【0029】本発明の製剤にはアルブミン、デキストラン、ビニル重合体、ゼラチンおよびヒドロキシリルエチル澱粉から選ばれた高分子物質を安定化剤として配合してもよい。

【0030】当該高分子は、薬物と共に当該脂質複合体内の空隙に取り込まれていてもよいし、また薬物を取り込んだ脂質複合体製剤に添加配合（すなわち、リボソーム外に添加・配合）してもよい。もちろん脂質複合体の内外ともに配合してもよいことはいうまでもない。

【0031】当該安定化剤の添加量は脂質1重量部に対して、0.5～1.0重量部、好ましくは1～5重量部である。

【0032】(III) GPIb・脂質複合体の医薬としての用途

本発明のGPIb・脂質複合体は、標識物質（いわゆるマーカー）を封入することにより診断薬としての態様を取ることができる。このような標識物質としては、RI（放射性同位元素）、MRI用常磁性金属、X線造影用ヨウ素化合物および蛍光物質等が挙げられる。

【0033】RIとしては、例えば、³H、¹⁴C、^{99m}Tc、¹²³I、¹³¹I、^{87a}Sr、^{113a}Inおよび¹⁹⁷Hg等が挙げられる。MRI用常磁性金属としては、例えば、クロム(Cr)、ガドリニウム(Gd)、マンガン(Mn)、鉄(Fe)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)、プラセオジウム(Pr)、ネオジウム(Nd)、サマリウム(Sm)、イッテルビウム(Yb)、テルビウム(Tb)、ジスプロシウム(Dy)、ホルミウム(Ho)、エルビウム(Er)および銅(Cu)等

の常磁性金属原子の2価または3価イオンが挙げられ、なかでも、好ましいのは、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウムおよび鉄等のイオンである。X線造影用ヨウ素化合物は、公知のX線造影剤として知られているものを利用できる。具体的には、アジピオドン、アミドトリゾ酸、イオダラム酸、イオバノ酸、イオベンザム酸、イオボダート、チロバノ酸、イオビドール、イオビドン、プロビリオドン、ヨーダミドまたはその塩（例えば、ナトリウム塩、メタルミン塩等）が例示される。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)およびカルボキシフルオレセイン(CF)等が例示される。

【0034】これらの標識物質は、公知の方法によって脂質複合体（リボソーム）に封入することができる。例えば、そのまま、塩の形態あるいはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびジエチレントリアミノ五酢酸(DTPA)等のキレート化剤により、キレート化して脂質複合体中に封入することができる。具体的に^{99m}Tcの場合、過テクネチウム酸ナトリウム、テクネチウムポリリン酸塩および^{99m}TcDTPA等を用いることができる。

【0035】本発明のGPIb脂質複合体には、血管損傷部位への集積性を有するために、薬物含有組成物（薬物運搬体）としての態様を取ることもできる。このような薬物としては、血管損傷部位へ集積させることによって生理学的、薬理学的に有効であるものであれば特に制限はなく、例えば、止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、血栓溶解剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤等が挙げられる。止血剤としては、カルバゾクロム、血液凝固因子(FVIII、FIX)、トロンビン、抗プラスミン剤（例えば、イプシロンアミノカプロン酸、トラネキサム酸）、硫酸プロタミン、エタンシラート、フィトナジオンおよび結合型エストロゲン（例えば、エストロン硫酸ナトリウム、エワイリン硫酸ナトリウム）等が例示される。血管収縮剤としては、ノルアドレナリン、ノルフェニリン、フェニレフリン、メタラミノール、メトキサミン、プロスタグランジンF_{1α}、プロスタグランジンF_{2α}およびトロンボキサンA₂等が例示される。抗炎症剤としては、ステロイド系抗炎症剤（テキサメサゾン、ハイドロコルチゾン、ブレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、メチルブレドニゾロン等）、非ステロイド系抗炎症剤（インドメタシン、アセメタシン、フルルビプロフェン、アスピリン、イブプロフェン、フルフェナム酸、ケトプロフェン等）等が例示される。血栓溶解剤としては、プラスミン、組織プラスミノーゲンアクティベーター、ウロキナーゼ等、またはその前駆体や誘導体等が例示される。抗血液凝固剤としては、ヘパリン等の酸性ムコ多糖類や、クマリン系抗凝固薬、ヒルジン等の天然抽出物やその誘導体、トロンボモジュリンや活性プロテインC等の生理活性物質等が例示される。抗

血小板剤としては、アスピリン、チクロビジン、シロスタゾール、プロスタサイクリン等が例示される。これらの薬物は公知の方法によって脂質複合体に封入する。

【0036】本発明のGPIb・脂質複合体は、GPIbとして、1日当たり0.001～1000mg程度を投与することができる。その投与量は患者の性別、年齢、症状等に応じて適宜増減できる。

【0037】本発明のGPIb・脂質複合体は、より好みしくは非経口的に投与される。具体的には、血管内（動脈内・静脈内）への注射、持続点滴、皮下投与、局所投与あるいは筋肉内投与等が例示される。

【0038】本発明のGPIb・脂質複合体を含む医薬組成物としては、血小板代用剤、血管障害、血管損傷および血栓症等の予防・治療等の医薬品、あるいはvWF欠損症等を診断するための診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等がある。血管損傷部位および血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても有用である。

【0039】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

実施例1

(1) 活性化NGPEの調製

NGPE 500μgに、1w/v%オクチルグルコシド/0.02M 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液(0.15M NaCl含有、pH 5.0) 500μlを添加した。0.25M EDCI/同MES緩衝液125μlおよび0.1M NHSS/同MES緩衝液125μlを添加し、室温で10分間インキュベーションした。アミコン30(分画分子量30,000)を用いて、0.5w/v%オクチルグルコシド/0.05M 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液(0.11M NaCl含有、pH 8.0)に対して限外濾過した。

【0040】(2) GPIbリポソームの調製

CHO細胞を用いて遺伝子工学的に产生したGPIbα鎖断片(His(1)~Arg(293)、分子量45,000)3mgを、0.05M HEPES緩衝液(0.11M NaCl含有、pH 8.0)に溶解し、この溶液に、PC溶液[卵黄ホスファチジルコリン(EPC)46.4mg、コレステロール11.6mg、ジパルミトイロホスファチジルグリセロール(DPPG)9.6mgおよびオクチルグルコシド250.6mgを、同HEPES緩衝液680μlに溶解したもの]を添加した。さらに、(1)で調製した活性化NGPEを添加した。なお、EPC:コレステロール:DPPG:GPIbの混合比(モル比)は100:50:20:1、EPC:オクチルグルコシドの混合比(モル比)は

0.07:1、活性化NGPE:GPIbの混合比(モル比)は10:1となるように調製した。37℃にて、4時間インキュベーションし、リポソームを調製した。ゲル濾過(担体:セファデックスG-75)により、オクチルグルコシドを除去した。CsCl密度勾配法による超遠心分離を行って、GPIbリポソームを回収した。その条件は以下の通りである。すなわち、試料1mlにCsCl 1500mgを溶解し、40%CsCl 1mlおよび生理食塩水0.2mlを重層し、55,000rpmで30分間遠心分離を行った。調製したGPIbリポソームのPC濃度は、1.365mg/mlであり、蛋白濃度は0.978mg/ml、平均粒子径は328nmであった。

【0041】実施例2

リン脂質1重量部に対して、CFが0.1重量部となるように添加し、実施例1に準じて製剤化を行い、CFを配合したGPIb・脂質複合体を調製した。

【0042】実施例3

リン脂質1重量部に対して、血液凝固因子FVIIIが0.1重量部となるように添加し、実施例1に準じて製剤化を行い、FVIIIを配合したGPIb・脂質複合体を調製した。

【0043】実施例4

リン脂質1重量部に対して、プロスタグランジンF_{1α}が0.01重量部となるように添加し、実施例1に準じて製剤化を行い、プロスタグランジンF_{1α}を配合したGPIb・脂質複合体を調製した。

【0044】実施例5

実施例のNGPEの代わりにNDPEを用いる以外は、実施例1に準じて製剤化を行い、GPIbリポソームを調製した。

【0045】比較例1

GPIbを結合しなかった以外は、実施例1と同様の手順でリポソームを得た。

【0046】実験例1

GPIbリポソームの凝集能を確認した。実施例1において調製したGPIbリポソーム(2×10¹²個/ml)、vWF(50μg/ml)、リストセチン(1mg/ml)の存在下に、10分間反応させ、散乱光凝集メーターを用いて測定した。また、同じ系を用いて、vWF抗体(50μg/ml)またはGPIb抗体(50μg/ml)の添加によるGPIbリポソームの凝集能の影響を調べた。併せて、リストセチン非存在下での効果を確認した。また、比較例1において調製したGPIbを結合しないリポソーム(2×10¹²個/ml)、vWF(50μg/ml)、リストセチン(1mg/ml)の存在下に、10分間反応させ、散乱光凝集メーターを用いて測定した。結果を表1に示す。

【0047】実験例2

実施例2～5で調製された各種GPIb・脂質複合体を

実験例1に準じて凝集能を確認した。その結果いずれの
製剤ともリストセチン存在下で、vWFと特異的に反応
し、凝集塊を形成した。

【0048】

【表1】

GPIb リポソーム	vWF	リストセチン	その他の添加物	凝集塊
2×10^{11} 個/ml	50 μg/ml	1mg/ml	なし	形成
2×10^{12} 個/ml	50 μg/ml	1mg/ml	vWF抗体 50 μg/ml	形成せず
2×10^{12} 個/ml	50 μg/ml	1mg/ml	GPIb抗体 50 μg/ml	形成せず
2×10^{12} 個/ml	50 μg/ml	なし	なし	形成せず
GPIbを結合 しないリポソーム 2×10^{12} 個/ml	50 μg/ml	1mg/ml	なし	形成せず

【0049】GPIbリポソームはリストセチン存在下で、vWFと特異的に反応し、凝集塊を形成した。この凝集はvWF抗体またはGPIb抗体を添加することにより完全に抑制した。リストセチン非存在下では、凝集は起こらなかった。一方、GPIbを結合しないリポソームではリストセチン存在下で凝集塊を形成しなかつた。従って、上記GPIbリポソームはvWFに結合でき、凝集塊も形成することが可能である。また、このことからGPIbリポソームは血小板代用剤として有用であることが判明した。

【0050】

【発明の効果】本発明のGPIb・脂質複合体はvWFと結合することができ、また、凝集を形成することができるから、血小板代用剤、血管障害、血管損傷および血栓症等の予防・治療等の医薬品として、あるいはvWF欠損症等を診断するための診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等として、幅広い実用化の可能性を有するものと期待される。また、本発明のGPIb・脂質複合体は、血管損傷部位に特異的に集積する性質を有することから、血管損傷部位および血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても極めて有用である。

フロントページの続き

(72)発明者 今川 昂

大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株
式会社ミドリ十字都島工場内

(72)発明者 池田 康夫

東京都豊島区巣鴨4-34-2

(72)発明者 村田 満

埼玉県新座市畠中1-9-46